

No title available.

Patent Number: FR2762394

Publication date: 1998-10-23

Inventor(s): DURACHER DAVID; MALLET FRANCOIS; ELAISSARI
ABDELHAMID; NOVELLI ROUSSEAU ARMELLE; PICHOT CHRISTIAN

Applicant(s):: BIO MERIEUX (FR)

Requested Patent: FR2762394

Application Number: FR19970004923 19970416

Priority Number(s): FR19970004923 19970416

IPC Classification: G01N33/531 ; G01N33/545 ; C07F3/06

EC Classification: C08F220/54, G01N33/543D, G01N33/543D4, G01N33/543F

Equivalents: AU7436298, EP0975968 (WO9847000), A3, JP2001521625T,
WO9847000

Abstract

The invention concerns a method for isolating a target biological material contained in a sample, consisting in the following steps: providing a capture phase, in microparticulate or linear form, consisting of at least a first particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and first complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a first transition metal, which is itself bound to a first biological entity capable of specifically recognising the target biological material; contacting said target biological material with at least the capture phase; and detecting the capture phase-target biological material complex, optionally with a detection phase, in microparticulate or linear form, and consisting of at least a second particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and second complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a second transition metal, which is itself bound to a second biological entity capable of specifically recognising the target biological material, and a marker.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 16.04.97.

③ Priorité :

④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.10.98 Bulletin 98/43.

⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦ Demandeur(s) : BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME
— FR.

⑦ Inventeur(s) : ELAISSARI ABDELHAMID, DURA-
CHER DAVID, PICHOT CHRISTIAN, MALLET FRAN-
COIS et NOVELLI ROUSSEAU ARMELLE.

⑦ Titulaire(s) :

⑦ Mandataire(s) : GERMAIN ET MAUREAU.

⑤ COMPOSE LIGAND DE COORDINATION ET UTILISATION POUR FIXER UN MATERIEL BIOLOGIQUE.

⑤ L'invention concerne un composé ligand de coordina-
tion, sous forme microparticulaire ou linéaire, comprenant
au moins un polymère particulaire ou linéaire, avec une sur-
face apparente hydrophile, et des groupes complexants li-
bres, un composé complexe comprenant ledit composé
ligand et un métal de transition, et les utilisations de ceux-ci
pour fixer un matériel biologique.

FR 2 762 394 - A1



La présente invention relève du domaine de la fixation d'un matériel biologique, contenu dans un échantillon, ledit matériel comprenant une partie susceptible d'interagir avec un métal de transition, en
5 formant des liaisons de coordination.

Dans la présentation de l'invention qui suit, il est en particulier fait référence à la fixation d'un matériel biologique protéique, mais bien entendu, la portée de l'invention ne saurait s'y limiter.

10 Ainsi, par matériel biologique, on entend selon l'invention, notamment, un matériel protéique ou glycoprotéique tel qu'un antigène, un haptène, un anticorps, une protéine, un peptide, une enzyme, un substrat, et fragments de ceux-ci ; mais aussi un matériel
15 nucléique tel qu'un acide nucléique (ADN ou ARN), un fragment d'acide nucléique, une sonde, une amorce ; une hormone ; à la condition que le matériel biologique comprenne une partie ou site d'interaction avec un métal de transition, en formant des liaisons de coordination.

20 Conformément à l'article de M. Kempe et al. (1), on connaît un procédé de capture d'une protéine présentant des séquences polyhistidines, à savoir la RNase A, selon lequel on utilise la forte affinité du groupement imidazole de l'histidine pour les métaux. Ce procédé
25 consiste à disposer de particules de silice, fonctionnalisées par des groupes méthacrylates, d'une part, à mettre en contact la protéine et un agent complexant des métaux, à savoir, l'acide N-(4-vinyl)-benzyl-iminodiacétique (VBIDA), avec un métal, pour
30 obtenir un complexe résultant de liaisons de coordination entre le métal et les groupes imidazole de l'histidine, et de liaisons de coordination entre le métal et les groupes carboxyliques de VBIDA, d'autre part, puis à mettre en contact lesdites particules de silice fonctionnalisées
35 avec le complexe formé ci-dessus.

Selon la présente invention, on apporte un procédé de fixation de matériel biologique, permettant d'optimiser la complexation de ce matériel avec un complexe métallique, tout en diminuant, voire éliminant, toute réaction
5 secondaire d'adsorption dudit matériel sur le complexe métallique.

A cette fin, le procédé de fixation d'un matériel biologique, de l'invention, utilise un composé ligand de coordination, ou un composé complexe obtenu à partir de ce
10 dernier, ledit composé ligand présentant les caractéristiques suivantes :

il est sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire,

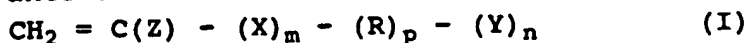
il est constitué par au moins un polymère
15 particulaire ou linéaire, avec une surface apparente hydrophile, et des groupes complexants libres, fixés de manière covalente.

Le terme "microparticulaire" signifie selon l'invention sous forme de particules d'une taille au plus
20 égale à 10 μm . De préférence elles ont une taille ne dépassant pas 5 μm .

Le polymère particulaire ou linéaire est avantageusement un polymère hydrophile, et notamment un polymère fonctionnalisé obtenu par polymérisation d'un
25 premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, au moins un agent de réticulation et au moins un second monomère, fonctionnel.

Pour l'obtention de ce polymère avantageux, le
30 premier monomère est de préférence choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamid ,
35 le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, 1 premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM). Le

ou les seconds m numères fonctionnels appartiennent de préférence au groupe de ceux qui répondent à la formule (I) suivante :



5 dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH₃)₂,

Y représente -CH₂-COOH, -N(CH₂-COOH)₂,
-N(CH-COOH)(CH₂-COOH), ou -N(CH₂-CH₂-NH₂)₂,

10 (CH₂-COOH)

X représente -NH(CH₂-CH₂-), -N(CH₂-CH₂-)₂,
-N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-), ou CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,

15 tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et
n est un entier variant entre 1 et 3.

A titre d'exemple le second monomère est choisi parmi
20 l'acide itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés méthacryliques.

Comme dit précédemment, le composé ligand de l'invention peut se présenter sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire.

25 Quand il est particulaire, ledit composé ligand peut ne consister qu'en ledit polymère particulaire, ou bien il peut posséder un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou non hydrophile, revêtu dudit polymère particulaire et/ou dudit polymère linéaire.

30 Ledit noyau du ligand particulaire est avantageusement choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes métalliques. Il peut en outre comprendre un composé magnétique.

Pour des utilisations particulières, le composé
35 ligand de l'invention peut être avantageusement marqué par un marqueur qui est, à titre d'exemple, choisi dans le

group consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant fluorescent, un composant radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un
5 haptène et un anticorps.

Comme les exemples de la présente description l'illustreront, le polymère particulaire préféré de l'invention est le poly-NIPAM (PNIPAM) comprenant des groupes complexants dérivés de l'acide itaconique ou de
10 l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

Un autre objet de l'invention est un composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand tel que défini ci-dessus et un métal de transition. Ce dernier est de préférence choisi parmi le zinc, le nickel, le
15 cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

L'invention concerne également une composition liquide d'un composé ligand de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue, dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins
20 un composé ligand de l'invention, ainsi qu'une composition liquide d'un complexe de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue dispersée dans cette dernière et constituée d'au moins un composé
25 complexe de l'invention.

L'invention apporte aussi un composé conjugué comprenant un composé complexe tel que défini précédemment et un premier matériel biologique fixé sur ledit composé complexe, par des liaisons de coordination entre le métal
30 de transition du composé complexe et les sites d'affinité du premier matériel biologique. Avantageusement le premier matériel biologique est une protéine. A titre d'exemple c'est la protéine p24 ou gp160 du VIH, en vue de la détection dans le sérum d'un patient d'anticorps dirigés
35 c ntr l'une u l'autre d c s protéines. C tte protéin peut aussi être choisi parmi la protéine A, la protéine G

et l'hybride de la protéine A et de la protéine G, sur laquelle des anticorps pourront être fixés en vue de la détection, dans un échantillon, d'antigènes spécifiques desdits anticorps.

5 Les sites d'affinité du matériel biologique considéré dans la présente invention, pour les ions métalliques de transition, consistent avantageusement en des sites riches en acides aminés choisis parmi l'histidine, la cystéine, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Ces sites
10 peuvent exister naturellement dans le matériel biologique, quand il est protéique notamment. Ou bien ils peuvent être "importés" préalablement dans le matériel biologique, selon des techniques bien connues de l'homme du métier telles que celle employée pour la purification des
15 protéines par le procédé IMAC (Immobilized Metal ion-Affinity Chromatography) sur des résines (2,3). A titre d'exemple, de tels sites peuvent être incorporés dans un matériel biologique protéique et notamment une protéine, par génie génétique pour obtenir des protéines
20 recombinantes.

Les sites peuvent se présenter sous la forme de suites desdits acides aminés identiques ou différents, contigus ou non, mais voisins. Lorsqu'ils sont "importés" dans le matériel biologique, on préférera les sites qui
25 consistent en des suites de 6 résidus histidine et/ou cystéine contigus.

D'autres objets de l'invention consistent en un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé ligand de l'invention,
30 un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé complexe de l'invention, et un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé conjugué de l'invention.

35 La présente invention concerne aussi les applications d'un composé ligand, d'un composé complexe et d'un composé

conjugué, répondant aux définitions ci-dessus, pour fixer un premier matériel biologique présentant des sites d'affinité pour un métal, et contenu dans un échantillon, et éventuellement un second matériel biologique susceptible de réagir avec le premier matériel biologique.

Par second matériel biologique susceptible de réagir avec le premier matériel biologique, on comprend un premier et un second matériels biologiques tels que définis précédemment, dont l'interaction est celle d'un ligand avec un anti-ligand, du type de celle intervenant entre un antigène et un anticorps, un anticorps et un haptène, une hormone et un récepteur, une protéine et un anticorps, la biotine et la streptavidine, une lectine et un sucre, deux oligonucléotides, un oligonucléotide et un acide nucléique, une enzyme et un substrat.

Selon une première utilisation d'un composé ligand de l'invention, un procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprend les étapes consistant à :

- a) à disposer d'un composé ligand décrit ci-dessus,
- b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé ligand en présence d'au moins un métal de transition,
- c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé ligand, le métal de transition et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

Selon une première utilisation d'un composé complexe de l'invention, un procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprend les étapes consistant à :

- a) à disposer d'un composé complexe défini ci-dessus,
- b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé complexe,
- c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé complexe

et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

Avantageusement, l'étape (b) des procédés décrits ci-dessus est effectuée à un pH supérieur ou égal au point
5 isoélectrique du premier matériel biologique à fixer, afin de réduire ou supprimer l'adsorption du matériel sur le composé complexe.

Le composé ligand, le composé complexe ou le composé conjugué peut aussi être utilisé dans un procédé de
10 fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec ledit premier matériel biologique. Ce procédé comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un composé conjugué de
15 l'invention, tel qu'obtenu à partir d'un composé ligand de l'invention en présence d'un métal de transition et du premier matériel biologique, ou à partir d'un composé complexe en présence du premier matériel biologique,

b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit
20 composé conjugué,

c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels biologiques, à séparer ledit composé conjugué portant le second matériel biologique.

25 Une variante du procédé qui vient d'être décrit est un procédé qui comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un support de l'invention, particulière ou non particulière recouvert au moins partiellement par un composé conjugué, tel qu'obtenu par
30 exemple, à partir d'un support recouvert d'un composé ligand de l'invention, d'un métal de transition et du premier matériel biologique, ou à partir d'un support recouvert d'un composé complexe de l'invention et du premier matériel biologique,

35 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit support,

c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels biologique, à séparer ledit support portant le second matériel biologique.

5 Le procédé de fixation d'un second matériel biologique dont deux variantes viennent d'être décrites peut comprendre en outre une étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel
10 biologique, obtenu selon (c), soit avec un composé ligand marqué et un métal de transition, soit avec un composé complexe marqué.

Avant d'exposer plus en détail l'invention dans les exemples, certains termes employés dans la présente
15 description et dans les revendications sont ci-après définis :

Par fixation d'un matériel biologique selon l'invention, on comprend la séparation, l'isolement, la détection et/ou quantification de ce matériel,
20 l'enrichissement d'une fraction en matériel biologique, selon une méthode de fixation spécifique ou aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative.

Un échantillon tel qu'on l'entend selon l'invention, comprend tout échantillon susceptible de contenir un
25 matériel biologique, notamment un échantillon tel que celui obtenu à partir d'un fluide biologique, un échantillon d'origine alimentaire, ou une culture cellulaire.

L'échantillon consiste en tout ou partie d'un autre
30 échantillon, en particulier il peut consister en un aliquote, une dilution.

La complexation telle qu'entendue selon la présente invention est définie par la formation d'un complexe de coordination entre un métal de transition et un composé
35 ligand, le métal de transition appartenant lui-même déjà à un complexe de coordination ou non.

Enfin par polymère fonctionnalisé, on entend un polymère présentant au moins une interface portant des groupes fonctionnels susceptibles de se fixer par covalence avec des groupes dits complexants.

5 Par groupe complexant, on comprend tout groupe susceptible d'interagir avec au moins un métal de transition pour former des liaisons de coordination avec celui-ci. A titre d'illustration, le document EP-A-0 570 022 décrit un bon nombre de groupes complexants
10 qui conviennent dans le cadre de la présente invention.

Un polymère thermosensible est caractérisé par un paramètre physico-chimique qui est sa température critique inférieure de solubilité (LCST) (4), au-delà ou en-deçà de laquelle, la conformation du polymère en solution change,
15 ainsi que ses propriétés physico-chimiques. Le poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) en est un exemple. Il possède une LCST de 32°C, température en-dessous de laquelle les chaînes de PNIPAM sont gonflées d'eau, donc hydratées et hydrophiles. Au-dessus de cette température,
20 on observe le phénomène inverse, les chaînes de PNIPAM se rétractent en expulsant l'eau et deviennent hydrophobes.

Les caractéristiques et avantages de la présente invention sont ci-après illustrés par les Exemples 1 à 5 et les Figures 1 à 3 selon lesquelles:

25 **Figure 1** représente un isotherme de couplage du polymère AMVE sur des particules de polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AEM).

Figure 2 représente la variation de la quantité de protéine RH24 adsorbée sur un polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu.
30

Figure 3 représente la quantité de protéine RH24 complexée sur un polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu et
35 pour une concentration en ions Zn^{2+} de l'ordre de 0,3 M.

EXEMPLE 1: Réactifs employés**Monomère :**

- Styrène à 99 % (Janssen Chemica, ref13 279-87),
Mw=104,5 g.mol⁻¹

5 Il est utilisé après purification par distillation sous vide.

- N-isopropylacrylamide (NIPAM) (Kodak ref 10 982),
Mw=113,16 g.mol⁻¹

10 Il est recristallisé avant son utilisation, comme suit. Il est dissous dans un mélange hexane/toluène (60/40, v/v).

Monomère fonctionnel :

- Chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM) (Kodak ref 18513), Mw=165,62 g.mol⁻¹

Il est utilisé sans recristallisation.

15 **Agent de réticulation :**

- N,N-méthylène bisacrylamide (MBA) (Amilabo ref 10897),
Mw=271.19 g.mol⁻¹

Il est utilisé sans recristallisation.

Amorceur :

20 - Hydrochlorure de 2,2'azobis (2-amidino propane) (V50) (Wako trade name), Mw = 271,19 g.mol⁻¹

Le V50 est recristallisé avant son utilisation, comme suit. L'amorceur est dissous dans un mélange 60/40 d'eau et d'acétone. La solution est filtrée sous vide avec un
25 rendement de 30%.

- Persulfate de potassium (Prolabo), Mw = 270,32 g.mol⁻¹

Il est utilisé sans recristallisation.

Groupes complexants :

- Acide itaconique (Aldrich), Mw = 132 g.mol⁻¹

30 Il est utilisé sans recristallisation.

- Anhydride maléique-co-méthylvinyléther
(Polysciences)

(AMVE)

Il est utilisé sans recristallisation.

EXEMPLE 2: Synthèse du ligand PNIPAM-acide itaconique

Dans un réacteur thermostaté de 250 ml, sont versés 4,38 g de N-isopropylacrylamide, 200 g d'eau, 0,37 g de MBA, 0,5 g d'acide itaconique et 0,45 g d'acrylamide. Le mélange est maintenu sous agitation à 300 tours par minute sous atmosphère d'azote et à une température de 70°C. Le persulfate de potassium (0,05 g), amorceur hydrosoluble, est introduit (en solution dans 5 g d'eau) dans la solution au dernier moment pour démarrer la réaction de polymérisation.

La polymérisation est poursuivie pendant 5 heures dans les mêmes conditions.

Le taux de conversion de la polymérisation est évalué à 98%.

Le ligand obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- le diamètre des particules, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, est de 1500 nm,
- le dosage des fonctions superficielles, suivi par conductimétrie, a donné 0,3 mmole/g de latex de groupements acide faible (-COOH).

EXEMPLE 3: Modification des particules hydrophiles aminées par greffage du polymère linéaire complexant poly-AMVE**1) Synthèse du polymère particulaire poly-(styrène-NIPAM)****a) Préparation du polymère particulaire hydrophile**

Selon cet exemple la préparation consiste :

dans un premier temps, à synthétiser un polymère poly-(St-NIPAM) contenant les monomères de base, à savoir le styrène et le NIPAM, selon une polymérisation en réacteur fermé, avec 200 g d'eau, 18 g de styrène, 2 g de NIPAM et 0,2 g de V50, puis

dans un deuxième temps, à ajouter, à un degré de conversion donné, 1 mmol fonctionnel (AEM), seul ou en présence des réactifs de base, à savoir 5 g de NIPAM, 0

à 4 % de AEM (par rapport au NIPAM), 0,122 g de V50 et 0,069 g de BA.

Cette technique permet d'optimiser l'incorporation en surface d'un monomère fonctionnel. Les conditions de
5 synthèse sont les mêmes que celles de la polymérisation en réacteur fermé, c'est-à-dire température et agitation constante.

b) Caractéristiques du polymère particulaire obtenu

10 Les résultats sur la structure du polymère obtenu, sa taille et sa polydispersité, sont regroupés dans le tableau 1 suivant.

Tabl au 1

Désigna- tion du polymère	AEM %	D(nm) 20°C (a)	D(nm) 50°C (a)	chevelure (nm) (b)	D(nm) MET (c)	Ip (c)
DD10	0	603	364	119	288	1.012
DD15	1	421	327	47	333	1.008
DD12	3	484	334	75	302	1.004
DD11	4	358	315	21	303	1.005

(a) : Diamètre déterminé par diffusion dynamique de la
5 lumière à 20°C et à 50°C

(b) : La chevelure correspond à l'épaisseur de PNIPAM à la
surface des particules

(c) : Diamètre et indice de polydispersité obtenu par
microscopie électronique.

10

Les taux de fonctionnalisation des polymères obtenus
exprimés par les résultats du dosage des fonctions amines
présentes à la surface des polymères, sont mentionnés dans
le tableau 2 suivant.

15

Tableau 2

Désignation du polymère	AEM (%) introduit	SPDP* mmol.m ⁻²
DD10	0	0.75
DD15	1	1.44
DD12	3	2.99
DD11	4	2.76

* : densité de charge calculée en utilisant la taille à
20 20°C déterminée par diffusion dynamique de la lumière.

2) Greffage du poly-AMVE sur les particules aminées

Le ligand est obtenu par fixation de façon covalente sur les polymères obtenus selon 1) de groupes complexants, consistant, selon le présent exemple, en des groupes
5 dérivés de l'AMVE (anhydride maléique-co-méthylvinyléther), qui est un polymère linéaire.

L'utilisation de l'AMVE présente deux avantages : d'une part, il permet, grâce à ses fonctions anhydrides très réactives, un couplage facile avec les amines
10 présentes à la surface du polymère particulaire, et, d'autre part, une fois le couplage réalisé, il expose de nombreuses fonctions dicarboxyliques complexantes, qui interagiront avec un métal de transition (Zn, Ni, Cu, Co,...).

15 L'AMVE est utilisé en solution dans le DMSO anhydre afin d'éviter l'hydrolyse des fonctions anhydrides par lesquelles la réaction de couplage sur les fonctions amines des polymères particulaires est possible. La réaction de couplage doit être conduite dans un milieu
20 basique afin d'éviter la protonation des fonctions amines des polymères. Le tampon utilisé est un tampon borate de pH 8,2 et de force ionique 10^{-2} M. Le milieu de couplage ne doit pas excéder 10 % en volume de DMSO.

Les résultats qui apparaissent à la Figure 1 montrent
25 une bonne corrélation entre les deux méthodes d'analyse. La pente initiale de l'isotherme de couplage montre que la réaction est totale pour des faibles quantités d'AMVE introduites. La valeur du plateau est de $2,75 \text{ mg.m}^{-2}$ et est atteinte très rapidement pour des faibles
30 concentration en AMVE.

EXEMPLE 4 : Complexation d'un métal de transition avec un ligand de l'invention

L'introduction d'un métal de transition dans une
35 solution du ligand obtenu selon l'Exemple 2 ou 3 doit permettre la fixation du métal par complexation sur les

particules. Cette complexation s'effectue par le biais des atomes d'oxygène des fonctions anhydrides. La présence de doublets libres sur les atomes d'oxygène permet de former des liaisons de coordination avec le métal de transition.

5 Le métal utilisé (Zn^{2+}) est introduit dans une solution du polymère afin d'obtenir une concentration en ion métallique en solution de 10^{-4} M. L'excès de cation métallique qui se trouve en solution est éliminé par des centrifugations successives.

10

EXEMPLE 5 : Complexation de la protéine RH24 selon un procédé de l'invention

La protéine étudiée dans le cadre de cet exemple est la protéine recombinante modifiée (appelé RH24) en N-terminal par un "Tag" histidine (séquence de six résidus histidine contigus) (5). Cette protéine a une masse de 27.10^3 g.mol⁻¹ et un point isoélectrique de 6,1. Cette modification a été mise à profit pour réaliser la complexation de la protéine sur un support particulière,
15
20 conformément au procédé de l'invention.

Afin de pouvoir déterminer la concentration de protéine complexée sur le latex, des études d'adsorption de la protéine ont été menées en parallèle.

Comme l'état de la technique le montre, ce sont les interactions électrostatiques qui gouvernent l'adsorption des protéines sur un polymère hydrophile (6). On a donc étudié l'effet de la force ionique et du pH sur la quantité de protéines adsorbées, afin de déterminer les conditions pour lesquelles l'adsorption est négligeable,
25
30 voire nulle.

La figure 2 montre l'adsorption de la protéine RH24 sur le ligand obtenu selon l'Exemple 3, poly-(St-NIPAM-AMVE).

Selon la figure 2, on observe que le taux d'adsorption de la RH24 est fortement dépendant du pH.
35

Une étude similaire a été effectuée pour la complexation en faisant varier les mêmes paramètres. La figure 3 montre les résultats de la complexation en fonction du pH, pour différentes forces ioniques et pour
5 des concentrations constantes en ion complexant (Zn^{2+}).

Comme il est observé sur cette figure, la complexation de la protéine sur le ligand poly-(St-NIPAM-AMVE) en présence de zinc est peu dépendante du pH excepté pour les faibles forces ioniques.

10 Ces résultats permettent de déterminer des conditions optimales de complexation au détriment de l'adsorption. Ainsi un pH supérieur ou égal à 7 permet d'avoir une adsorption quasi nulle tout en ayant une complexation proche de $1,5 \text{ mg.m}^{-2}$. Quant à la force ionique il faut
15 qu'elle soit minimale pour favoriser la complexation.

BIBLIOGRAPHIE

- 5 (1) Kempe M., Glad M. & Mosbach K., *Journal of molecular recognition*, **8**, 35 (1995)
- (2) Porath J., Carlsson., Olsson., Belfrage J., *Nature*, **258**, 598 (1975)
- (3) Porath J., *Trends Anal. Chem.*, **7**, 254 (1988)
- 10 (4) Hiroshi Inomata et al., *Macromolecules*, **27**, 6459-6464 (1994)
- (5) Cheynet V., Verrier B., Mallet F., *proteine expression and purification*, **4**, 367 (1993)
- (6) Suzawa T., Shirahama H., *Advanced in Colloid and Interface Science*, **35**, 139 (1991).

REVENDICATIONS

1. Composé ligand de coordination, sous forme microparticulaire ou linéaire, constitué par au moins un polymère particulaire ou linéaire, avec une surface apparente hydrophile, et des groupes complexants libres.

2. Composé ligand selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit polymère est choisi dans le groupe des polymères hydrophiles.

3. Composé ligand selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polymère est un polymère fonctionnalisé obtenu par polymérisation d'un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, d'au moins un agent de réticulation et d'au moins un second monomère, fonctionnel.

4. Composé ligand selon la revendication 3, caractérisé en ce que le premier monomère est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

5. Composé ligand selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ou les seconds monomères fonctionnels répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH₃)₂,

Y représente -CH₂-COOH, -N(CH₂-COOH)₂, -N(CH-COOH)(CH₂-COOH), ou -N(CH₂-CH₂-NH₂)₂, (CH₂-COOH)

X représente -NH(CH₂-CH₂-), -N(CH₂-CH₂-)₂, -N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-), u CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome, tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et n est un entier variant entre 1 et 3.

6. Composé ligand selon la revendication 5, caractérisé en ce que le second monomère est choisi parmi l'acide itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés méthacryliques.

7. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est sous forme microparticulaire et en ce que la taille moyenne des particules est au plus égale à 5 μ m.

8. Composé ligand selon la revendication 7, caractérisé en ce que chaque particule comprend en outre un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou non hydrophile.

9. Composé ligand selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit noyau est choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes métalliques.

10. Composé ligand selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit noyau renferme en outre un composé magnétique.

11. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit polymère, ledit polymère étant linéaire.

12. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit polymère, ledit polymère étant particulaire.

13. Composé ligand selon la revendication 7, caractérisé en ce que lesdites particules consistent en un polymère particulier, hydrophile avec des groupes complémentaires.

14. Composé ligand selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit polymère est le PNIPAM et les groupes complexants sont dérivés de l'acide itaconique ou de l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

5 15. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est sous forme linéaire.

16. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend en
10 outre un marqueur.

17. Composé ligand selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit marqueur est choisi parmi le groupe consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant fluorescent, un composant
15 radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un haptène et un anticorps.

18. Composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 14, et éventuellement 16, et un métal de transition.

19. Composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand selon la revendication 15, et éventuellement 16, et un métal de transition.

25 20. Composé complexe selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que le métal de transition est choisi parmi le zinc, le nickel, le cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

30 21. Composition liquide d'un ligand de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue, dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins un composé ligand selon l'une
qu lconque des rev ndications 1 à 17.

35 22. Composition liquide d'un complexe de coordination, comprenant une phase continue aqueus et une

phase discontinue dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

23. Composé conjugué comprenant un composé complexe
5 selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 et un premier matériel biologique fixé sur ledit composé complexe.

24. Composé conjugué selon la revendication 23, caractérisé en ce que le premier matériel biologique est
10 une protéine.

25. Composé conjugué selon la revendication 23, caractérisé en ce que le premier matériel biologique est la protéine A, la protéine G ou un hybride de la protéine A et de la protéine G.

15 26. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 7 à 16.

27. Support particulaire recouvert au moins partiellement par un composé ligand selon l'une quelconque
20 des revendications 7 à 16.

28. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

29. Support particulaire recouvert au moins
25 partiellement par le composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

30. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 23 à 25.

30 31. Support particulaire recouvert au moins partiellement par un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 23 à 25.

32. Procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprenant une partie susceptible de réagir
35 avec un métal de transition, et contenu dans un

échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

- a) à disposer d'un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 17,
- 5 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé ligand en présence d'au moins un métal de transition,
- c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé ligand, le métal de transition et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

33. Procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprenant une partie susceptible de réagir avec un métal de transition, et contenu dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

- a) à disposer d'un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20,
- b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé complexe,
- 20 c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé complexe et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

25 34. Procédé de fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec un premier matériel biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

- a) à disposer d'un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 23 à 25,
- 30 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé conjugué,
- c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels biologiques, à séparer ledit composé conjugué portant le second matériel biologique.

35. Procédé de fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec un premier matériel biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

5 a) à disposer d'un support selon la revendication 30 ou 31,

 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit support,

 c) après avoir éventuellement observé
10 l'interaction entre le premier et le second matériels biologiques, à séparer ledit support.

36. Procédé selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le
15 second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel biologique, obtenu selon (c), avec un composé ligand selon la revendication 16 ou 17 et un métal de transition.

37. Procédé selon la revendication 34 ou 35,
20 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel biologique, obtenu selon (c), avec un composé complexe marqué selon la revendication 18 ou 19.

25 38. Procédé selon la revendication 32 ou 33, caractérisé en ce que l'étape (b) est effectuée à un pH supérieur ou égal au point isoélectrique du premier matériel biologique.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications
30 32 à 38, caractérisé en ce que le premier matériel biologique est riche en histidine et/ou en cystéine.

40. Procédé selon l'une quelconque des revendications
34 à 38, caractérisé en ce que le second matériel biologique est riche en histidine et/ou en cystéine.

41. Pr cédé selon l'une qu lconque des revendications 39 ou 40, caractérisé en ce que le premier et éventuellement le second matériels biologiques sont des matériels protéiques.

1/3

FIG1

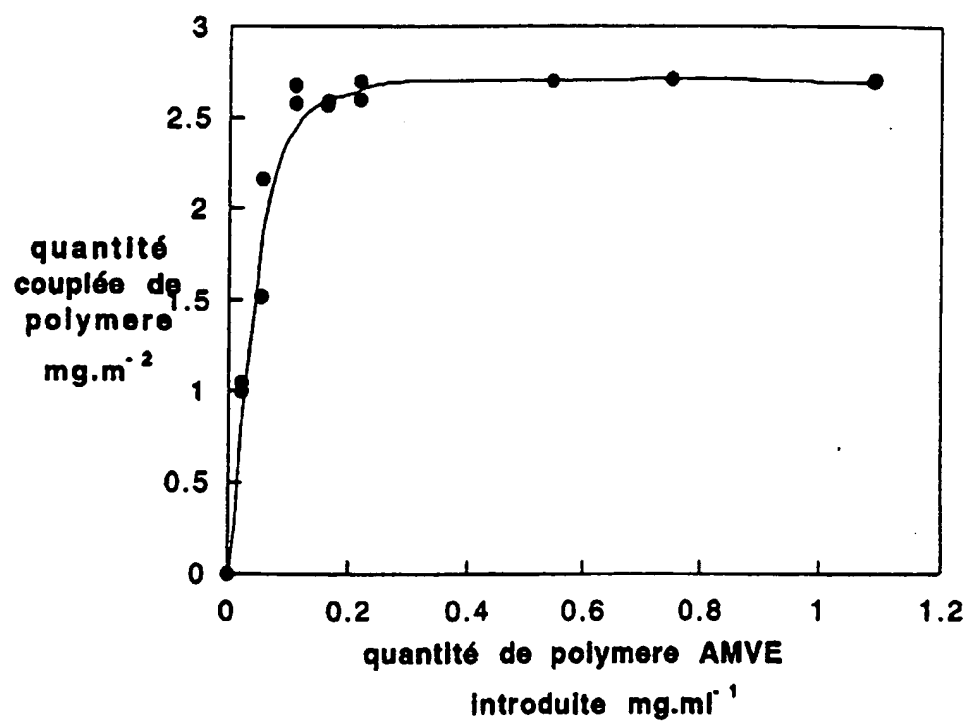
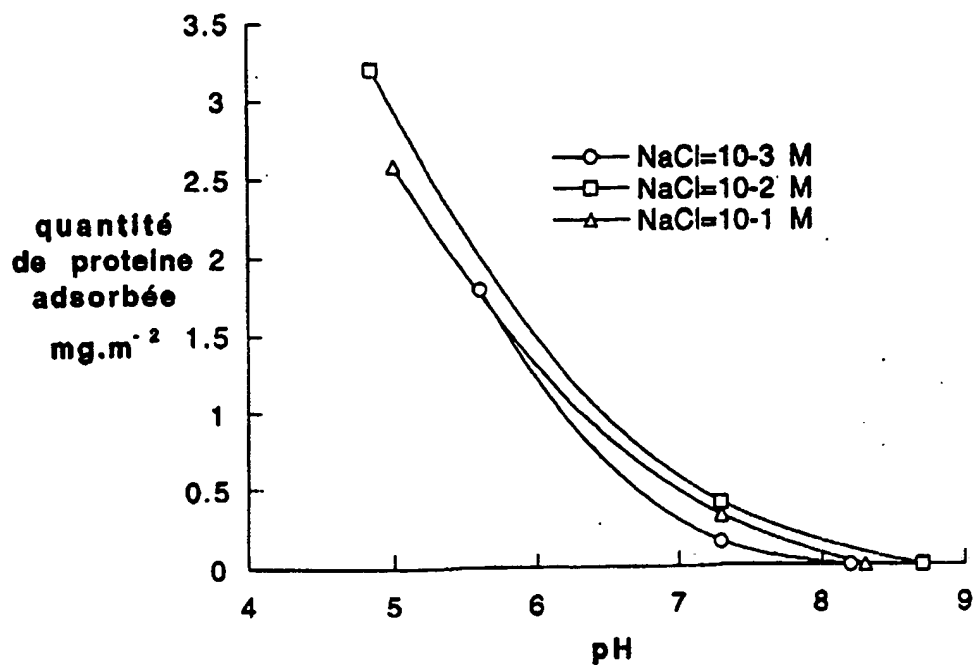
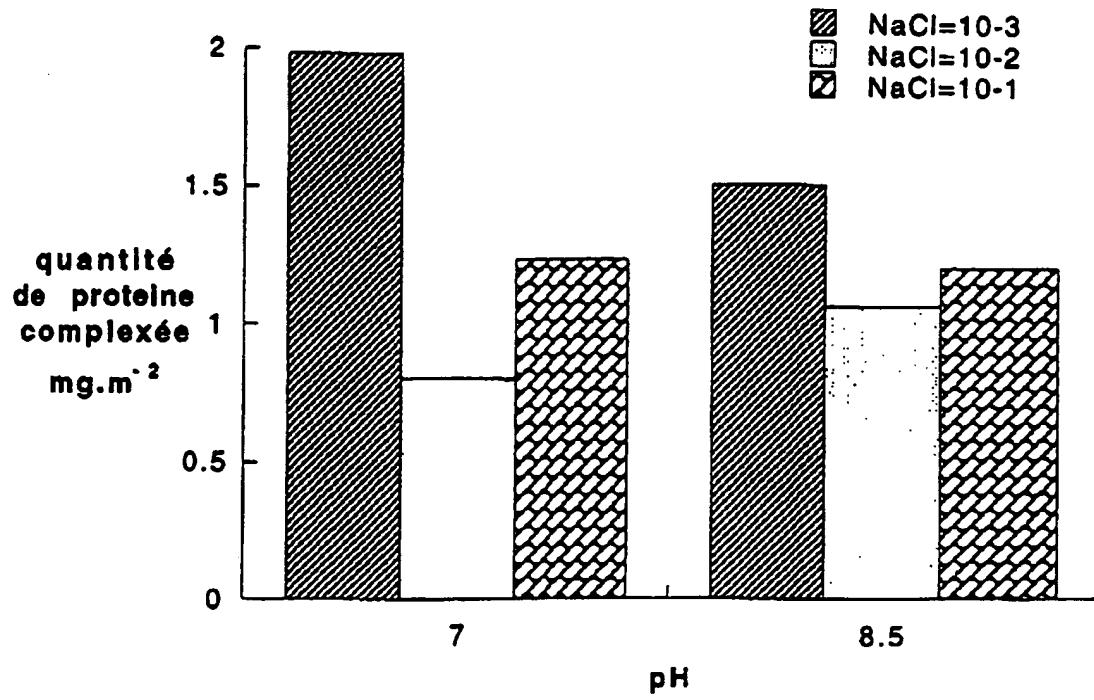


FIG 2



3/3

FIG 3



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 545855
FR 9704923

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 4 246 350 A (HIER DEBORAH E ET AL)	1,2,7,8, 17-24
Y	* exemples 1,2 * ---	25-41
X	FR 2 268 818 A (CESKOSLOVENSKA AKADEMIE VED) * page 3 - page 4; exemples 9,12,15 *	1-3,7, 15,21
X	EP 0 659 779 A (FUJIMORI KOGYO CO)	1-3,7, 21,27
Y	* tableau 2 * ---	26,28-41
X	EP 0 056 664 A (EASTMAN KODAK CO) * le document en entier *	1,2,15, 18-23,26
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8822 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A14, AN 88-150567 XP002050519 & JP 63 090 521 A (NIPPON ZEON KK) , 21 avril 1988	1-7,21
Y	* abrégé * ---	3-7,13, 14
Y	US 3 880 814 A (MIZUTANI KIYOSHI) * abrégé * ---	3-7,13, 14
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9027 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A14, AN 90-206403 XP002050520 & JP 02 138 317 A (NIPPON OILS & FATS CO LTD) , 28 mai 1990 * abrégé * ---	4-7,13, 14
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 janvier 1998		Wells, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 00.02 (P04C13)

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 545855
FR 9704923

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 455 359 A (IPPOLITI J THOMAS ET AL)	1,2, 18-24,27
Y	* colonne 11, ligne 12 - ligne 52 *	26,28-41
X	US 5 180 822 A (MCQUIGG DONALD W ET AL) * le document en entier *	1,2, 18-21
Y	US 5 244 816 A (SUBRAMANIAN RAMASWAMY) * colonne 4 *	27-41
Y,D	KEMPE M ET AL: "An Approach to Surface Imprinting Using The Enzyme Ribonuclease A" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 8, 1995, page 35 XP002050518 * page 36; figure 1 *	25
A	US 5 132 243 A (OHDAIRA AKIO ET AL) * abrégé *	1
A	US 4 784 912 A (SCHAEFFER JAMES R ET AL) * abrégé *	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 janvier 1998		Wells, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

3

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)